savyonDIAGNOSTICS



REF A291-01M

SeroCP™ Quant IgG

IVD

2c° 8c°

Test (ELISA), immunoenzymatique utilisant un antigène absorbé, pour la détermination semi - quantitative d’anticorps IgG spécifiques pour *Chlamydia pneumoniae*, dans un sérum humain.

Pour usage professionnel uniquement



CE 0483

SeroCP™ Quant IgG

Utilisation prévue

Le kit "SeroCP™ Quant IgG" est un test immunoenzymatique utilisant un antigène adsorbé, pour la détermination semi-quantitative d'anticorps IgG spécifiques pour *Chlamydia Pneumoniae* dans un sérum humain.

Pour Diagnostic ***In Vitro***.

Introduction

Chlamydia pneumoniae (TWAR-183) est un agent infectieux important présentant de nombreuses manifestations cliniques, parmi lesquelles des infections des voies respiratoires supérieures et inférieures (1). La majorité des infections à *C.pneumoniae* sont bénignes et asymptomatiques bien que, pouvant parfois provoquer des maladies plus sévéres comme des pharyngites, des sinusites, des bronchites et des pneumonies qui s'acquièrent par contagion en public. Une infection non détectée et non soignée peut conduire à une maladie prolongée et persistante. Des comptes-rendus récents indiquent une association possible entre l'infection à *C.pneumoniae* et des maladies chroniques (2).
La prévalence de *C.pneumoniae*, dans le sérum chez les enfants, est basse mais elle augmente fortement jusqu'à l'âge adulte où, ensuite elle demeure élevée (>50%).

Les difficultés pour prélever un échantillon ainsi qu'une inaccessibilité du site infecté portent sérieusement atteinte à l'utilité des méthodes de détection directe. C'est pourquoi une méthode de diagnostic indirect comme la sérologie est couramment utilisée et sert d'outil pour l'identification des deux types d'infections à chlamydiae : l'infection distale et l'infection chronique (3) - là où des méthodes directes sont rarement efficaces (4). De plus, la présence de certains types d'anticorps peuvent aussi fournir une indication quant au stade de la maladie.
Une primo-infection à *C.pneumoniae* est caractérisée, par une réponse prédominante des IgM, dans un délai de 2 à 4 semaines, et une réponse retardée des IgG et IgA, dans un délai de 6 à 8 semaines. Après une infection aiguë à *C.pneumoniae*, les anticorps IgM disparaissent habituellement en 2 à 6 mois (5), les titres d'anticorps IgG diminuent lentement ; tandis-que les anticorps IgA tendent à disparaître rapidement (6). Quand une primo-infection à *C.pneumoniae* est suspectée, la détection d'IgM est très importante pour le diagnostic (7). Cependant, dans les infections récurrentes ou chroniques, la prévalence des IgM est basse et, par conséquent, une absence d'IgM n'exclue pas nécessairement une infection en cours.
Dans une ré-infection, les taux d'IgG et IgA augmentent rapidement, souvent en moins de une à deux semaines (8).
Les anticorps IgA ont montré qu'ils peuvent constituer un marqueur immunologique fiable des primo-infections, chroniques et récurrentes. D'habitude, ces anticorps,

diminuent rapidement, pour atteindre un niveau de base, après traitement et éradication des infections à *C.pneumoniae* (3). La persistance de titres élevés d'anticorps IgA est généralement considérée comme le signe d'une infection chronique (6).
Les anticorps IgG persistent pendant de nombreuses années et déclinent très lentement. En conséquence, la présence d'anticorps IgG est essentiellement l'indication d'une infection à *C.pneumoniae* à un moment indéterminé. Cependant, une augmentation du taux des IgG de quatre fois plus peuvent indiquer une infection chronique actuellement en cours.

Le test "SeroCP™ Quant" utilise une technique ELISA dans laquelle des corpuscules élémentaires purifiés de *C.pneumoniae* (souche TWAR-183) sont utilisés en tant qu'antigènes pour détecter la réponse anticorps chez l' homme. Pour un diagnostic complet des infections courantes, chroniques ou passées, il est recommandé de rechercher les anticorps IgG, IgM et IgA anti-*C.Pneumoniae*.

Principe du test

- Des plaques de micro - "SeroCP™ Quant" sont revêtues de corpuscules élémentaires purifiés de *C.Pneumoniae* (TWAR - 183).

- Le sérum à tester est dilué et incubé dans la microplaque pendant 1 heure, à 37°C. Au cours de cette étape, les anticorps anti-*C.Pneumoniae* se lient aux antigènes immobilisés.dans la microplaque.

- Les anticorps non-spécifiques et non liés sont éliminés par lavage.

- Un IgG anti-humain conjugué à la Peroxydase de Raifort (HRP - Horse Radish Peroxydase) est ajouté et incubé 1 heure, à 37°C. Pendant cette étape, le Conjugué - HRP se lie au, complexe antigène-anticorps.formé.

- Le conjugué non lié est éliminé par lavage.

- Après l'addition du substrat - TMB, celui ci est hydrolysé par la peroxydase, produisant une coloration bleue de substrat réduit.

- L''addition de la solution d'arrêt, entraîne un changement de coloration du bleu au jaune.

- La lecture s'effectue avec un lecteur de microplaque à une longueur d'onde de 450/620nm.

- La densité optique est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques liés aux antigènes immobilisés.

Composition du coffret

Kit de 96 déterminations

1. **Plaque de micro-titration:** de 96 -puits sécables (8x12) revêtus d'antigènes *C.pneumoniae*, conservée dans un sachetd'aluminium contenant un dessicateur.
   1 plaque
2. **Tampon de lavage concentré (20X):** Tampon PBS – Tween, (pH 7,4–7,6) contenant du NaCl, du Na_2HPO_4, du KH_2PO_4 et du Tween 20.
   1 flacon, 100ml
3. **Diluant pour sérum (bleu):** solution-tampon prête à l'emploi. Contient moins de 0,05% de Proclin,(conservateur).
   1 flacon, 60ml
4. **Diluant pour Conjugué (vert):** Solution-tampon, prête à l'emploi Elle contient moins de 0,05% de Proclin,(conservateur).
   1 flacon, 40ml
5. **Contrôle négatif:** Sérum humain négatif pour IgG anti-*C.pneumoniae*, prêt à l'emploi Contient moins de 0,1% de sodium azide, en tant que produit conservateur.
   1 flacon, 2ml
6. **Contrôle positif:** Sérum humain positif pour IgG anti-*C.pneumoniae*, prêt à l'emploi. Contient moins de 0,1% d'azide de sodium (conservateur).
   1 flacon, 2ml
7. **Calibrateur P-10:** Un sérum humain positif pour IgG anti-*C.pneumoniae*, prêt à l'emploi Contient 10 BU/ml. Contient moins de 0,1% de azide de sodium et moins de 0,05% de Proclin, (conservateur).
   1 flacon, 2ml
8. **Calibrateur P-50:** Un sérum humain positif pour IgG anti-*C.pneumoniae*, prêt à l'emploi Contient 50 BU/ml. Contient moins de 0,1% de azide de sodium et moins de 0,05% de Proclin, (conservateur).
   1 flacon, 2ml
9. **Calibrateur P-100:** sérum humain positif pour IgG anti-*C.pneumoniae*, prêt à l'emploi Contient 100 BU/ml. Contient moins de 0,1% de azide de sodium et moins de 0,05% de Proclin, (Conservateur).
   1 flacon, 2ml
10. **Conjugué - HRP, concentré (300X):** IgG anti-humain (spécifique de la chaîne gamma) conjugué à la peroxydase de raifort (HRP). Contient moins de 0,05% de Proclin, (conservateur).
    1 flacon, 0,2ml
11. **Substrat-TMB:** solution prête à l'emploi. Contient une 3, 3', 5, 5'–tétraméthyl benzidine en tant que chromogène et un peroxyde en tant que substrat.
    1 flacon, 14ml
12. **Solution d'Arrêt:** Solution de H_2SO_4, 1M. Prêt à l'emploi
    1 flacon, 15ml
13. **Couvercle pour microplaque** **1 unité**
14. **Manuel d'instructions.** **1**

Matériel nécessaire mais non fourni

1. Des tubes à essais propres pour dilution des sérums de patients.
2. Des tubes de plastique, pour dilution du conjugué – HRP concentré.
3. Des micro-pipettes et des pipettes à volume réglable (de 5 à 50µl, de 50 à 200µl et de 200 à 1000µl) et des embouts jetables.
4. Un flacon d'une contenance de 1 litre.
5. Une éprouvette d'une contenance de 50ml.
6. Une bouteille pour les lavages.
7. Du papier absorbant.
8. Un Vortex.
9. Un bain-marie à 37°C avec couvercle ou, une chambre humide placée dans un incubateur à 37°C.
10. Un lecteur de microplaque'ELISA avec filtres à 450 et 620nm.
11. De l'eau distillée bouteille ou doublement désionisée.

Avertissement et précautions

A usage diagnostique *In Vitro*, exclusivement

1. Ce kit contient des sérums humains qui ont été testés par des techniques approuvées par la FDA, et CE -Ils ont été trouvés dépourvus d'antigène HBs,d'ac VIH 1 et 2, et anti HCV ,comme aucune technique ne peux garantir l'innocuité absolue des matériels testés ,ceux-ci doivent donc être manipulés comme potentiellement infectieux- selon les recommandations publiées dans le manuel "Sécurité biologique dans les laboratoires de microbiologie et de biologie médicale, 1988" de CDC/NIH (National Institute of Health - Institut National de la Santé américain).
2. La solution de Substrat - TMB est un produit fortement irritant pour la peau et les muqueuses. Evitez tout contact direct.
3. Tous les composés de ce kit ont été calibrés et testés, par lot. Il n'est pas recommandé de mélanger des réactifs issus de différents lots, car cela pourrait nuire aux résultats.
4. L'acide sulfurique dilué (H_2SO_4, 1M) est un agent irritant pour les yeux et la peau. En cas de contact avec les yeux, rincez aussitôt abondamment avec de l'eau la zone touchée et consulter un médecin.

Stockage et durée de conservation

1. Tous les réactifs fournis devront être stockés à 2-8°C. Les flacons de réactifs qui n'ont pas été ouvertes sont stables jusqu'à la date d'expiration inscrite sur l'emballage du kit. Une exposition, à la température ambiante, pendant quelques heures, des composés bouchés ou scellés à l'origine,n'est pas préjudiciable. **NE PAS CONGELER.**
2. Une fois ouvert, la durée de conservation du kit est de 90 jours.

3. Les barrettes (de microtitration) non utilisées doivent être conservées dans le sachet d'aluminium avec le dessicateur, en enroulant l'extrémité ouverte et la scellant étroitement avec un ruban adhésif sur toute la longueur de l'ouverture.
4. Des cristaux peuvent se former, dans le tampon de lavage concentré 20 fois, lors du stockage au froid – cela est parfaitement normal. Dissoudre les cristaux en ramenant le tampon à 37°C avant de le diluer. Une fois diluée, la solution peut être stockée à 2-8°C, sa stabilité est de 21 jours.

Recueil des échantillons

Préparer les sérums à partir d'échantillons collectés de manière aseptique, en utilisant des techniques standards. Ne pas inactiver les sérums par chauffage. L'utilisation de sérums lipémiques, troubles ou contaminés n'est pas recommandé. Des substances particulières et des précipités dans les sérums peuvent donner des résultats erronés. De tels spécimens devront subir une clarification par centrifugation ou filtration avant d'effectuer le test.

Stockage des échantillons

Les échantillons de sérums devront être stockés à 2-8°C et testés dans un délai de 7 jours. (Il est fortement recommandé d'ajouter 0,1% d'azide de Sodium. Alliqoter les échantillons et les stocker à –20°C. si l'on prévoit une plus longue période de stockage, Eviter d'effectuer des décongélations et re-congélations répétées.

Procédure - Manuelle

Procédure sur automate disponible sur demande.

A. Préparation des réactifs

1. Amener les réactifs et les échantillons cliniques à température ambiante. Bien mélanger les calibrateurs (P10, P50, P100), le contrôle négatif et le contrôle positif ainsi que les échantillons cliniques, avant l'utilisation.
2. Déterminer le nombre total d échantillons devant être testés. Outre ces derniers, doivent être inclus dans chaque test : un puit pour le Contrôle Positif, un autre pour le Contrôle Négatif et, trois puits pour les calibrateurs (P10, P50, P100).
3. Retirer la plaque de microtitration de sa pochette d'aluminium en coupant l'une des extrémités, près de la partie scellée. Garder le nombre de barrettes (de microtitration) nécessaires, selon le nombre d'échantillons à tester, dans le support microplaque.
4. Diluer 20 fois (1/20) le tampon de lavage concentré, avec de l'eau doublement dés ionisée ou distillée en bouteille - Exemple, pour préparer 1 litre de liquide de lavage ajouter, à 950ml d'eau doublement désionisée ou distillée en bouteille 50ml du tampon de lavage concentré.

B. Incubation des échantillons de sérums et des contrôles

5. Diluer chaque sérum de patient 400 fois, (1:400), avec la solution de dilution pour sérum fournie, en utilisant l'une des méthodes suivantes :
   a. **Méthode recommandée pour l'utilisation d'un système automatisé: (Cette méthode nécessite en plus une autre bouteille de solution de dilution pour sérum).**
   - Faire une 1ere dilution en ajoutant 10µl de sérum de patient à 990µl de diluant pour sérum (dilution 1:100)
   - Puis distribuer 45µl de diluant pour sérum Ajouter 15µl de l'échantillon pré-dilué 1:100 dans les puits réservés au dosage,
   - Distribuer 60µl de chacun des contrôles (Positif et Négatif) et des 3 calibrateurs (P10, P50, P100), prêts à utiliser, dans les 5 1ers puits réservés à la calibration

   b. **Méthode recommandée pour l'utilisation d'un système manuel:**
   - Ajouter 10µl de sérum de patient à 190µl de diluant pour sérum (dilution 1:20).
   - Rediluer encore en ajoutant 10µl de la dilution 1:20 à 190µl de diluant pour sérum.
   - Distribuer 50µl de chacun des contrôles (Positif et Négatif) et des 3 calibrateurs - prêts à l'emploi- ainsi que de chaque échantillons de sérums dilués, dans des puits séparés
6. Couvrir les barrettes avec le couvercle de plaque et incuber 1 heure à 37°C.
7. Eliminer le contenu liquide des puits.
8. **Etapes de lavage:** remplir,à ras-bord, chaque puit avec du liquide de lavage (300-350µl) puis éliminer ce liquide. Répéter encore deux fois, pour un total de trois étapes de lavage.
9. Sécher délicatement les barrettes, leur cadre en les tapotant délicatement au-dessus d'un papier absorbant propre.

C. Incubation du Conjugué

10. Le conjugué IgG anti-humain concentré devra être dilué extemporanément avant 'utilisation. Diluer le conjugué IgG anti-humain concentré Cà HRP, au 1/300, avec le diluant pour conjugué.
    Par exemple, pour deux barrettes, préparer un minimum de 3ml de conjugué, comme suit: 10µl de IgG anti-humain concentré, sera mélangé à 3ml de diluant pour conjugué.
11. Distribuer 50µl de conjugué dilué dans chaque puit.
12. Couvrir les barrettes avec le couvercle pour plaque et incuber 1 heure à 37°C dans une chambre humide.
13. Eliminer le contenu des puits et laver comme décrit, ci-dessus - étapes 8-9.

D. Incubation avec le Substrat-TMB

14. Distribuer 100µl de Substrat-TMB dans chaque puits, couvrir les barrettes avec le couvercle pour plaque et incuber à la température de la pièce, pendant **15 minutes**.
15. Arrêter la réaction en ajoutant 100µl de Solution d'Arrêt (H_2,SO_4 1M), dans chaque puit.

E. Calcul des résultats

16. Déterminer l'absorbance à 450/620nm et enregistrer les résultats. La lecture doit être faite dans les 30 minutes qui suit   l'arrêt de la réaction chromogène.

Note: *éliminer toutes les bulles d'air avant de procéder à la lecture. Le dessous de la plaque d'ELISA doit être soigneusement essuyé.*

Test de validation

Les critères suivants doivent être respectés pour valider la série. Au cas où ces critères ne seraient pas satisfaits, le test sera considéré comme non valable et devra être répété.

1. D.O $_{P100\ /\ P10}$ > **2,5**
2. D.O $_{P50\ /\ P10}$ > **1,7**
3. Contrôle Négatif devra être < **10 BU/ml**
4. Contrôle Positif devra être > **30 BU/ml**

Calcul des résultats du test

Méthode manuelle, en utilisant un papier millimétré:

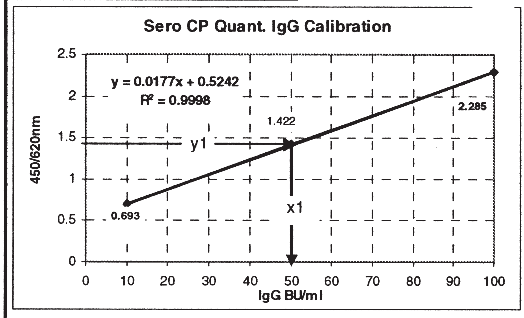
1. Marquer les valeurs de l'absorbance (D.O.) des 3 calibrateurs (P10, P50, P100) sur l'axe des Y (des ordonnées), face aux concentrations (BU/ml) sur l'axe des X (des abscisses).
2. Tracer la ligne la plus adaptée aux points marqués (qui passe au plus près de ceuxci).
3. En utilisant la courbe standard, interpoler la valeur de la concentration d'un échantillon testé (en BU/ml), à partir de chaque absorbance mesurée (voir exemple1).

Exemple 1: Interpolation des résultats

Sur l'axe des ordonnées, lire la valeur de l'absorbance de l'échantillon et tracer une ligne horizontale jusqu'à la courbe

A partir de l'intersection , tracer une ligne verticale vers l'axe des abscisses et lire la concentration en BU/ml de l'échantillon.

Calibrators	IgG BU/ml	OD 450/620nm
P10	10	0.693
P50	50	1.422
P100	100	2.285
Sample	x1=55	y1=1.5



Interprétation des résultats

IgG BU/ml	Résultat	Interprétation diagnostique
< 10 BU/ml	**Négatif** Pas d'anticorps IgG détectables	**Pas d'indication d'une infection à *C.pneumoniae***
10 BU /ml	**Positif** Il y a un niveau significatif d'anticorps IgG	**Indication d'une infection à *C.pneumoniae*, en cours ou passée[1].**

BU: Unité arbitraire (Binding Units)

[1] pour faire la différence entre une infection passée et une infection en cours, il est recommandé de tester un second échantillon 2 à 4 semaines plus tard. Si la valeur EPT du 2 nd échantillon est 4 fois plus grande que la 1ère valeur EPT (utilisé la table ci-dessous), alors ces dosages indiquent une infection.

Corrélation entre résultats SeroCP™ Quanti en BU /ml et SeroFIA™ en dilution point final (EPT)

Les coffrets semi-quantitatifs SeroCP™ IgG Quant ont été calibrés par comparaison au système MIF (SeroFIA™ IgG Savyon diagnostic.)
La corrélation est présentée dans le tableau n°1.

Tableau n°1:

SeroCP™ IgG Quant BU/ml	SeroFIA™ IgG Titre en dilution point final (EPT)
< 10	Négatif
10-30	64
31-50	128
51-80	256
> 80	512

Note: Il n'existe pas de standardisation des différents résultats obtenus avec le système MIF. Chaque test donne des EPT différents.

Caractéristiques des performances

Comparaison de "SeroCP™ Quant IgG" avec "SeroCP™ IgG"

Le SeroCP™ Quant IgG a été évalué par rapport au SeroCP™ IgG.
(Savyon Diagnostics Ltd. Israel, REF: 191-01)

L'étude a utilisé 197 échantillons de sérums issus de personnes présentant des symptômes et de 34 personnes bien portantes.

La sensibilité et la spécificité ont été calculées:
Sensibilité : 190/197 = 96,4%
Spécificité : 33/34 = 97%.

Réaction croisée Cross Reaction

Des patients hospitalisés, infectés par *C.trachomatis*, *CMV* et *EBV* et diagnostiqués par des trousses commerciales (sérodiagnostic), ont été également testés avec la trousse SeroCP™ Quant. Aucune réaction croisée significative n'a été détectée.

Limites du test Test Limitations

1. Un seul test sérologique ne doit pas suffire pour un diagnostic final. Toutes les données cliniques et du laboratoire doivent être prises en compte.
2. Des échantillons obtenus trop tôt lors d'une infection primaire peuvent ne pas contenir d'anticorps détectable. Si une infection à Chlamydiae est suspectée, un second échantillon doit être prélevé 2 à 4 semaines plus tard et être testé en parallèle avec le premier échantillon.
3. Substances interférentes : L'utilisation de sérum lipémique, trouble ou contaminé est déconseillée. La présence de particules ou de précipité dans le sérum peut causer des résultats erronés ; ces sérums doivent être clarifiés par centrifugation ou filtrés avant d'être utilisé pour le dosage.

Bibliography

1. Kuo, C.C., Jackson L.A. and Grayston, J.T. (1995). *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) Clin Microbiol REV; 8:451-461.
2. Saikku, P., Leinonen, M., Tenkanen, L., Linnanmaki, E., Ekman, M.R., Manninen, V., Manttari, M., Frick, M.H. and Huttunen, J.K. (1992). Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki heart study. Ann. Intern. Med. 116: 273-278.
3. Puolakkainen, M., Saikku, P., Leinonen, M., Nurminen, M., Vaananen, P. and Makela, P.H. (1984). *Chlamydia pnemonitis* and its serodiagnosis in infants. J. Infect. Dis. 149: 598-604.
4. Campbell, L.A. (1993). PCR detection of *Chlamydia pneumoniae* In Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications (Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C. and White, T.J., Eds). ASM Press. pp. 247-252.
5. Henry-Suchet, J., Askienazy-Elbhar, M., Thibon, M., Revol, C. and Akue, B.A. (1994). Post-therapeutic evolution of serum *chlamydia* antibody titers in women with acute salpingitis and tubal infertility. Fertility and Sterility. 62: No. 3.
6. Saikku, P., Matila, K., Nieminen, M.S., Huttunen, J.K., Leinon, M., Eckman, M.R., Makela, P.H. and Valtonen, V. (1988). Serological Evidence of an Association of a Novel *Chlamydia* TWAR with Chronic Coronary Heart Disease and Acute Myocardial Infarction. Lancet. 2: 983-986.
7. Grayston, J.T., Cambell, L.A., Mordhorst, C.H., Saikku, P., Thom, D. and Wang, S.P. (1989). A New Respiratory Pathogen: *Chlamydia pneumoniae* Strain TWAR. J. Inf. Dis. 161: 618-625.
8. Saikku, P., Leinonen, M., Tenkanen, L., Linnanmaki, E., Ekman, M.R., Mannin, V., Manttari, M., Frick, M.H. and Huttunen, J.K. (1992). Chronic *Chlamydia pneumoniae* Infections as a Risk Factor for Coronary Heart Disease in the Helsinki Heart Study. Ann. of Int. Med. 116: 273-278.

M291-01F 05-07/15

Distributeur en France:



14 Rue Ambrioise Croizat
77183 Croissy Beaubourg
Tel: +33 1 64 62 10 12
Fax: +33 1 64 62 09 66
info@theradiag.com



SAVYON DIAGNOSTICS Ltd.
3 Habosem St. Ashdod 7761003, Israel
Tel: 972.8.8562920 Fax: 972.8.8523176
e-mail: support@savyondiagnostics.com

EC REP

Obelis s.a. (European Authorized Representative)
Boulevard Général Wahis 53, 1030 Brussels, Belgium
Tel.: +32.2.732.59.54 Fax.: +32.2.732.60.03
e-mail: mail@obelis.net